

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-135073

(43)Date of publication of application : 13.05.2003

(51)Int.Cl.

C12N 15/09  
A61P 43/00  
C07K 16/40  
C12N 1/15  
C12N 1/19  
C12N 1/21  
C12N 5/10  
C12N 9/02  
C12Q 1/48  
G01N 33/15  
G01N 33/50  
G01N 33/53  
G01N 33/573  
// A61K 45/00

(21)Application number : 2001-337467

(71)Applicant : INST OF PHYSICAL &amp; CHEMICAL RES

(22)Date of filing : 02.11.2001

(72)Inventor : SUDO TATSUHIKO  
OSADA HIROYUKI(54) NEW SPLICING VARIANT OF MAP KINASE p38 $\alpha$ 

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To identify a new splicing variant of MAP kinase p38 $\alpha$  caused by a selective splicing, and further to clone a gene encoding the variant, and to elucidate the structure and the function of the gene.

SOLUTION: This protein has one of the following amino acid sequences: (a) a specific amino acid sequence; (b) an amino acid sequence obtained by deletion, substitution and/or insertion of one to several amino acids in the specific amino acid sequence, and having the MAP kinase activity substantially the same as that of the specific amino acid sequence; or (c) an amino acid sequence having  $\geq 60\%$  homology to the specific amino acid, and having the MAP kinase activity substantially the same as that of the specific amino acid sequence.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19)日本国特許庁 (J P)

(12)公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2003-135073

(P 2 0 0 3 - 1 3 5 0 7 3 A)

(43)公開日 平成15年5月13日(2003.5.13)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード (参考)
C12N 15/09	ZNA	A61P 43/00	111 2G045
A61P 43/00	111	C07K 16/40	4B024
C07K 16/40		C12N 1/15	4B050
C12N 1/15		1/19	4B063
1/19		1/21	4B065

審査請求 未請求 請求項の数10 O L (全15頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2001-337467(P 2001-337467)	(71)出願人	000006792 理化学研究所 埼玉県和光市広沢2番1号
(22)出願日	平成13年11月2日(2001.11.2)	(72)発明者	須藤 龍彦 埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所内
		(72)発明者	長田 裕之 埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所内
		(74)代理人	110000109 特許業務法人特許事務所サイクス (外3名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】MAPキナーゼp38αの新規なスプライシング変異体

(57)【要約】 (修正有)

【課題】 選択的スプライシングの結果生じるMAPキナーゼp38αの新たなスプライシング変異体を同定し、該変異体をコードする遺伝子をクローニングし、該遺伝子の構造と機能を解明すること。

【解決手段】 下記の何れかのアミノ酸配列を有するタンパク質。(a) 特定なアミノ酸配列；(b) 特定なアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸が欠失、置換及び／又は挿入したアミノ酸配列であって、特定なアミノ酸配列と実質的に同等のMAPキナーゼ活性を有するアミノ酸配列；または(c) 特定なアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列であって、前記アミノ酸配列に記載のアミノ酸配列と実質的に同等のMAPキナーゼ活性を有するアミノ酸配列。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 下記の何れかのアミノ酸配列を有するタンパク質。

(a) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列；(b) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸が欠失、置換及び／又は挿入したアミノ酸配列であって、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列と実質的に同等の MAP キナーゼ活性を有するアミノ酸配列；または

(c) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列と 60 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列であって、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列と実質的に同等の MAP キナーゼ活性を有するアミノ酸配列。

【請求項 2】 請求項 1 に記載のタンパク質をコードする遺伝子。

【請求項 3】 下記の何れかの塩基配列を有する遺伝子。

(a) 配列番号 2 に記載の塩基配列；(b) 配列番号 2 に記載の塩基配列において 1 から数個の塩基が欠失、置換及び／又は挿入した塩基配列であって、配列番号 2 に記載の塩基配列がコードするタンパク質と実質的に同等の MAP キナーゼ活性を有するタンパク質をコードする塩基配列；または (c) 配列番号 2 に記載の塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列であって、配列番号 2 に記載の塩基配列がコードするタンパク質と実質的に同等の MAP キナーゼ活性を有するタンパク質をコードする塩基配列。

【請求項 4】 請求項 2 または 3 に記載の遺伝子を含むベクター。

【請求項 5】 請求項 4 に記載のベクターを有する形質転換体。

【請求項 6】 請求項 5 に記載の形質転換体を用いることを特徴とする、MAP キナーゼ p 38  $\alpha$  スプライシング変異体の製造方法。

【請求項 7】 請求項 1 に記載のタンパク質に対する抗体。

【請求項 8】 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列の 254 位から 307 位までのアミノ酸配列を認識する、請求項 7 に記載の抗体。

【請求項 9】 請求項 1 に記載のタンパク質の発現を測定又は検出することを含む、医薬のスクリーニング方法。

【請求項 10】 請求項 1 に記載のタンパク質の発現を測定又は検出することを含む、MAP キナーゼ関連疾患の診断方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、MAP キナーゼ p 38  $\alpha$  の新規なスプライシング変異体に関する。本発明はまた、該変異体をコードする遺伝子、該遺伝子を有するベクター、該遺伝子を有する形質転換体、該変異体に

対する抗体、並びに、該変異体を利用した医薬のスクリーニング法及び疾患の診断方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 MAP キナーゼ（マイトジェン活性化蛋白質リン酸化酵素）は、プロテインキナーゼの中のセリン・スレオニンキナーゼに属する分子量約 4 万のタンパク質リン酸化酵素で、酵母から高等脊椎動物に至るまで広く真核生物に存在する。本酵素が活性化されるためにはそのサブドメイン VII と VIII の間に存在するスレオニンおよびチロシン残基がともにリン酸化を受ける必要がある、これを行う酵素（MAP キナーゼキナーゼ）もその活性化に自身のリン酸化が必要で、この一連のリン酸化反応は MAP キナーゼカスケードを形成する。MAP キナーゼは様々な転写因子を活性化することにより細胞内の情報伝達に重要な役割を果たしている。

【0003】 近年、MAP キナーゼに関して多くの研究がなされ、情報伝達機構の解析が急速に進んできている。MAP キナーゼには、細胞外シグナル認識タンパクキナーゼ（ERK）、C-Jun アミノ末端キナーゼ（JNK）、p 38、BMK などがある。これら一群の酵素の中で、ERK に関する研究が最も進んでおり、Raf を介した増殖シグナルを、TCF/Elk-1 をリン酸化することにより核内へ伝えるとされている。また、p 38 は、JNK と共に Stress-Activated-Protein-Kinase（SAPK）を構成するリン酸化酵素で、TNF  $\alpha$  や IL-1  $\beta$  などのサイトカイン、UV 及び浸透圧などの細胞外環境の変化に応答して活性化され、数々の遺伝子の転写を制御していることが明らかになってきている。しかし、培養細胞を用いた実験からだけでは、両者の機能の違いを見いだすには至らなかった。本発明者らは、抗炎症剤 SB202190 や SB203580 が p 38 に結合することから、炎症への関与が示唆されていた p 38 の制御を目的として、その生理機能や活性化機構の解析を行ってきた。これまでに、この分子が炎症だけではなく、マウス発生にも必要不可欠であり、少なくとも胚発生の特定の時期には、JNK によって p 38 の機能が相補されないこと（Cell, 102, 221-231, 2000）、p56<sup>lck</sup> 結合タンパク質として同定された p62 により活性調節を受けていること（Biochem. Biophys. Res. Commun., 269, 521-525, 2000）、JNK により転写活性化領域がリン酸化されて活性化する c-Jun の DNA 結合領域をリン酸化すること（Methods Enzymol, 322 "Apoptosis", 388-392, 2000）、比較的広範に発現していると理解されてきた p 38  $\alpha$  が、生理的条件下では細胞種特異的に存在していること（Brain Res. 887, 352-360, 2000）などを明らかにしてきた。また、p 38 はこれまでに  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$  が同定されており、中でも p 38  $\alpha$  には p 38（CSBP 2）、CSBP 1、Mxi 2 の 3 つのスプライシングフォームが知られている。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、選択的スプ



ライシング(alternative splicing)の結果生じる、MAPキナーゼ p38 $\alpha$ の新たなスプライシング変異体を同定することを目的とする。本発明はまた、該変異体をコードする遺伝子をクローニングし、該遺伝子の構造と機能を解明することを目的とする。本発明はさらに、該変異体に対する抗体、該変異体を利用した医薬のスクリーニング方法及び疾患の診断方法を提供することを目的とする。

#### 【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記課題を解決するために、鋭意研究を重ねた結果、ヒト腎癌細胞株より抽出したmRNAから逆転写したcDNAの中に、MAPキナーゼ p38 (CSBP2) をコードする遺伝子より短い遺伝子が存在することを見出し、この遺伝子の構造と機能を解析したところ、本遺伝子が、MAPキナーゼ p38 $\alpha$ の新規なスプライシング変異体であることがわかった。本発明はこれらの知見に基づいて完成したものである。

【0006】本発明のタンパク質は、MAPキナーゼ p38 $\alpha$ のこれまで同定されている p38 (CSBP2)、CSBP1、Mxi2 の3つのスプライシングフォームとは異なる、選択的スプライシングによる新規な変異体（以下、本変異体をEXIPと称することもある）である（図1）。EXIPは307個のアミノ酸から成り、C末側の53アミノ酸を除いては p38 のアミノ酸が保存されている。配列に違いの見える p38 のC末側には、情報伝達の特異性を決める配列が含まれていることが明らかになっており、このことは、EXIPが従来の p38 の情報伝達経路とは全く異なる経路に位置する可能性を示唆するものである。

【0007】すなわち、本発明によれば、下記の何れかのアミノ酸配列を有するタンパク質が提供される。

(a) 配列番号1に記載のアミノ酸配列；(b) 配列番号1に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸が欠失、置換及び／又は挿入したアミノ酸配列であって、配列番号1に記載のアミノ酸配列と実質的に同等のMAPキナーゼ活性を有するアミノ酸配列；または

(c) 配列番号1に記載のアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列であって、配列番号1に記載のアミノ酸配列と実質的に同等のMAPキナーゼ活性を有するアミノ酸配列。

【0008】本発明の別の側面によれば、上記した本発明のタンパク質をコードする遺伝子が提供される。本発明の遺伝子の具体例としては、下記の何れかの塩基配列を有する遺伝子が提供される。

(a) 配列番号2に記載の塩基配列；(b) 配列番号2に記載の塩基配列において1から数個の塩基が欠失、置換及び／又は挿入した塩基配列であって、配列番号2に記載の塩基配列がコードするタンパク質と実質的に同等のMAPキナーゼ活性を有するタンパク質をコードする

塩基配列；または(c) 配列番号2に記載の塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列であって、配列番号2に記載の塩基配列がコードするタンパク質と実質的に同等のMAPキナーゼ活性を有するタンパク質をコードする塩基配列。

【0009】本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明の遺伝子を含むベクター。本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明のベクターを有する形質転換体が提供される。本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明の形質転換体を用いることを特徴とする、MAPキナーゼ p38 $\alpha$ スプライシング変異体の製造方法が提供される。

【0010】本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明のタンパク質に対する抗体が提供される。好ましくは、配列番号1に記載のアミノ酸配列の254位から307位までのアミノ酸配列を認識する抗体が提供される。本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明のタンパク質の発現を測定又は検出することを含む、医薬のスクリーニング方法が提供される。本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明のタンパク質の発現を測定又は検出することを含む、MAPキナーゼ関連疾患の診断方法が提供される。

#### 【0011】

【発明の実施の形態】以下、本発明の実施態様及び実施方法について詳細に説明する。

#### (1) 本発明のタンパク質及び遺伝子

本発明は、下記の何れかのアミノ酸配列を有するタンパク質、並びにそれをコードする遺伝子に関する。

(a) 配列番号1に記載のアミノ酸配列；(b) 配列番号1に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸が欠失、置換及び／又は挿入したアミノ酸配列であって、配列番号1に記載のアミノ酸配列と実質的に同等のMAPキナーゼ活性を有するアミノ酸配列；

(c) 配列番号1に記載のアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列であって、配列番号1に記載のアミノ酸配列と実質的に同等のMAPキナーゼ活性を有するアミノ酸配列；

【0012】本発明の遺伝子の具体例としては、下記の何れかの塩基配列を有する遺伝子が挙げられる。

(a) 配列番号2に記載の塩基配列；(b) 配列番号2に記載の塩基配列において1から数個の塩基が欠失、置換及び／又は挿入した塩基配列であって、配列番号2に記載の塩基配列がコードするタンパク質と実質的に同等のMAPキナーゼ活性を有するタンパク質をコードする塩基配列；または(c) 配列番号2に記載の塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列であって、配列番号2に記載の塩基配列がコードするタンパク質と実質的に同等のMAPキナーゼ活性を有するタンパク質をコードする塩基配列；

【0013】上記した「配列番号1に記載のアミノ酸配

列において1から数個のアミノ酸が欠失、置換及び／又は挿入したアミノ酸配列」における「1から数個」の範囲は特に限定されないが、例えば、1から20個、好ましくは1から10個、より好ましくは1から7個、さらに好ましくは1から5個、特に好ましくは1から3個程度を意味する。

【0014】上記した「配列番号1に記載のアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列」とは、該アミノ酸配列と配列番号1に記載のアミノ酸配列との相同性が少なくとも60%以上であり、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上であり、最も好ましくは98%以上であることを意味する。

【0015】上記した「配列番号2に記載の塩基配列において1から数個の塩基が欠失、置換及び／又は挿入した塩基配列」における「1から数個」の範囲は特に限定されないが、例えば、1から60個、好ましくは1から30個、より好ましくは1から20個、さらに好ましくは1から10個、特に好ましくは1から5個程度を意味する。

【0016】上記した「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列」とは、DNAをプローブとして使用し、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランクハイブリダイゼーション法、あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法を用いることにより得られるDNAの塩基配列を意味し、例えば、コロニーあるいはブランク由来のDNAまたは該DNAの断片を固定化したフィルターを用いて、0.7~1.0MのNaCl存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1~2×SSC溶液(1×SSC溶液は、150mM塩化ナトリウム、15mMクエン酸ナトリウム)を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNA等を挙げることができる。ハイブリダイゼーションは、Molecular Cloning: A laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY., 1989. 以後「モレキュラークローニング第2版」と略す)等に記載されている方法に準じて行うことができる。

【0017】ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAとしては、プローブとして使用するDNAの塩基配列と一定以上の相同性を有するDNAが挙げられ、例えば70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは93%以上、特に好ましくは95%以上、最も好ましくは98%以上の相同性を有するDNAが挙げられる。

【0018】上記した「配列番号1に記載のアミノ酸配列と実質的に同等のMAPキナーゼ活性を有する」とは、配列番号1に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸が欠失、置換及び／又は挿入したアミノ酸配列を有するタンパク質が、配列番号1に記載のアミノ

酸配列を有するタンパク質と実質的に同等のMAPキナーゼ活性を発揮することをいう。ここで「MAPキナーゼ」とは、基質であるMAP(マイトジェン活性化蛋白質)に作用してこれをリン酸化する作用をいう。

【0019】本発明の遺伝子の取得方法は特に限定されない。本明細書中の配列表の配列番号1および配列番号2に記載した塩基配列及びアミノ酸配列の情報に基づいて適当なプローブやプライマーを調製し、それらを用いてヒトのcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより本発明の遺伝子を単離することができる。ヒト由来のcDNAライブラリーは、本発明の遺伝子を発現している細胞、器官または組織から作製することが好ましい。当該遺伝子を発現している細胞の具体例としてはヒト腎臓細胞株OS-RC-2などが挙げられるが、これに限定されるわけではない。

【0020】PCR法により配列番号2に記載した塩基配列を有するDNAを取得することもできる。ヒトcDNAライブラリーを鋳型として使用し、配列番号2に記載した塩基配列を増幅できるように設計した1対のプライマーを使用してPCRを行う。

【0021】PCRの反応条件は適宜設定することができる。例えば、94℃で30秒間(変性)、55℃で30秒~1分間(アニーリング)、72℃で2分間(伸長)からなる反応工程を1サイクルとして、例えば30サイクル行った後、72℃で7分間反応させる条件などを挙げることができる。次いで、増幅されたDNA断片を、大腸菌等の宿主で増幅可能な適切なベクター中にクローニングすることができる。

【0022】上記したプローブ又はプライマーの調製、cDNAライブラリーの構築、cDNAライブラリーのスクリーニング、並びに目的遺伝子のクローニングなどの操作は当業者に既知であり、例えば、モレキュラークローニング第2版、Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1~38, John Wiley & Sons (1987-1997)(以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーと略す)等に記載された方法に準じて行うことができる。

【0023】本明細書中上記した、(b)配列番号2に記載の塩基配列において1から数個の塩基が欠失、置換及び／又は挿入した塩基配列であって、配列番号2に記載の塩基配列がコードするタンパク質と実質的に同等のMAPキナーゼ活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を有する遺伝子(変異遺伝子)は、化学合成、遺伝子工学的手法又は突然変異誘発などの当業者に既知の任意の方法で作製することもできる。具体的には、配列番号2に記載の塩基配列を有するDNAを利用し、これらDNAに変異を導入することにより変異DNAを取得することができる。

【0024】例えば、配列番号2に記載の塩基配列を有するDNAに対し、変異原となる薬剤と接触作用させる



方法、紫外線を照射する方法、遺伝子工学的手法等を用いて行うことができる。遺伝子工学的手法の一つである部位特異的変異誘発法は特定の位置に特定の変異を導入できる手法であることから有用であり、モレキュラー・クロニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載の方法に準じて行うことができる。

【0025】本明細書中上記した、(c) 配列番号2に記載の塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列であって、配列番号2に記載の塩基配列がコードするタンパク質と実質的に同等のMAPキナーゼ活性を有するタンパク質をコードする塩基配列は、上述の通り、一定のハイブリダイゼーション条件下でコロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランクハイブリダイゼーション法、あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法などを行うことにより得ることができる。

【0026】次に、本発明のタンパク質の入手・製造方法について説明する。本発明のタンパク質の入手・製造方法は特に限定されず、天然由来のタンパク質でも、化学合成したタンパク質でも、遺伝子組み換え技術により作製した組み換えタンパク質の何れでもよい。比較的容易な操作でかつ大量に製造できるという点では、組み換えタンパク質が好ましい。

【0027】天然由来のタンパク質を入手する場合には、該タンパク質を発現している細胞または組織からタンパク質の単離・精製方法を適宜組み合わせて単離することができる。化学合成タンパク質を入手する場合には、例えば、Fmoc法(フルオレニルメチルオキシカルボニル法)、tBoc法(t-ブチルオキシカルボニル法)等の化学合成法に従って本発明のタンパク質を合成することができる。また、各種の市販のペプチド合成機(例えば、桑和貿易(米国Advanced Chem Tech社製)、パーキンエルマージャパン(米国Perkin-Elmer社製)、ファルマシアバイオテック(スウェーデンPharmacia Biotech社製)、アロカ(米国Protein Technology Instrument社製)、クラボウ(米国Synthecell-Vega社製)、日本パーセプティブ・リミテッド(米国PerSeptive社製)、島津製作所等)を利用して本発明のタンパク質を合成することもできる。

【0028】本発明のタンパク質を組み換えタンパク質として産生するには、該タンパク質をコードする塩基配列(例えば、配列番号2に記載の塩基配列)を有するDNAまたはその変異体または相同体を入手し、これを好適な発現系に導入することにより本発明のタンパク質を製造することができる。発現ベクターおよび形質転換体の作成およびそれを用いた組み換えタンパク質の産生については本明細書中後記する。

【0029】なお、配列番号1に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸が欠失、置換及び/又は挿入したアミノ酸配列を有するタンパク質、又は配列番号

1に記載のアミノ酸配列と60%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有するタンパク質は、配列番号1に記載のアミノ酸配列をコードするDNA配列の一例示す配列番号2に記載の塩基配列の情報に基づいて当業者であれば適宜製造または入手することができる。

【0030】例えば、配列番号2に記載の塩基配列又はその一部を有するDNAプローブとしてヒトまたはヒト以外の生物より、該DNAのホモログを適当な条件下でスクリーニングすることにより単離することができる。このホモログDNAの全長DNAをクロニング後、発現ベクターに組み込み適当な宿主で発現させることにより、該ホモログDNAによりコードされるタンパク質を製造することができる。

【0031】(2) 本発明の遺伝子を有するベクター  
本発明の遺伝子は適当なベクター中に組み込んで組み換えベクターとして使用することができる。ベクターの種類は発現ベクターでも非発現ベクターでもよく、目的に応じて選ぶことができる。クロニングベクターとしては、大腸菌K12株中で自律複製できるものが好ましく、ファージベクター、プラスミドベクター等いずれでも使用できる、具体的には、ZAP Express [ストラタジーン社製、Strategies, 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK(+) [Nucleic Acids Research, 17, 9494 (1989)]、Lambda ZAPII (ストラタジーン社製)、λgt10、λgt11 [DNA Cloning, A Practical Approach, 1, 49 (1985)]、λTriplEx (クローンテック社製)、λExCell (ファルマシア社製)、pT7T318U (ファルマシア社製)、pcD2 [Mol. Cell. Biol., 3, 280 (1983)]、pMW218 (和光純薬社製)、pUC118 (宝酒造社製)、pEG400 [J. Bac., 172, 2392 (1990)]、pQE-30 (QIAGEN社製)等を挙げるができる。

【0032】発現ベクターとしては、好ましくは宿主細胞において自立複製可能であるか、あるいは宿主細胞の染色体中へ組込み可能であるものを使用する。また、発現ベクターとしては、本発明の遺伝子を発現できる位置にプロモーターを含有しているものが使用される。

【0033】細菌を宿主細胞として用いる場合は、本発明の遺伝子を発現させるための発現ベクターは該細菌中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、上記DNAおよび転写終結配列より構成された組換えベクターであることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

【0034】細菌用の発現ベクターとしては、例えば、pBTrp2、pBTac1、pBTac2 (いずれもベーリンガー・マンハイム社より市販)、pKK233-2 (Pharmacia社製)、pSE280 (Invitrogen社製)、pGEMEX-1 (Promega社製)、pQE-8 (QIAGEN社製)、pQE-30 (QIAGEN社製)、pKYP10 (特開昭58-110600)、pKYP200 [Agric. Biol. Chem., 48, 669 (1984)]、PLS A1 [Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)]、pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306 (1985)]、pBlues

criptIII SK+, pBluescriptIII SK(-) (Stratagene社製)、pTrs30 (FERMBP-5407)、pTrs32 (FERM BP-5408)、pGEX (Pharmacia社製)、pET-3 (Novagen社製)、pTerm2 (US4686191, US4939094, US5160735)、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pUC18 [Gene, 33, 103(1985)]、pUC19 [Gene, 33, 103(1985)]、pSTV28 (宝酒造社製)、pSTV29 (宝酒造社製)、pUC118 (宝酒造社製)、pQE-30 (QIAGEN社製)等が挙げられる。細菌用のプロモーターとしては、例えば、trpプロモーター(P trp)、lacプロモーター(P lac)、P<sub>l</sub>プロモーター、P<sub>g</sub>プロモーター、P<sub>g</sub>プロモーター等

の、大腸菌やファージ等に由来するプロモーター、SP01プロモーター、SP02プロモーター、penPプロモーター等を挙げることができる。

【0035】酵母用の発現ベクターとして、例えば、YE p13 (ATCC37115)、YEp24 (ATCC37051)、Ycp50 (ATCC37419)、pHS19、pHS15等を例示することができる。酵母用のプロモーターとしては、例えば、PH05プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、gal1プロモーター、gal10プロモーター、ヒートショックタンパク質プロモーター、MF $\alpha$ 1プロモーター、CUP1プロモーター等のプロモーターを挙げることができる。

【0036】動物細胞用の発現ベクターとして、例えば、pcDNA1、pcDM8 (フナコシ社より市販)、pAGE107 [特開平3-22979; Cytotechnology, 3, 133, (1990)]、pAS3-3 (特開平2-227075)、pCDM8 [Nature, 329, 840, (1987)]、pcDNA1/AmP (Invitrogen社製)、pREP4 (Invitrogen社製)、pAGE103 [J. Biochem., 101, 1307(1987)]、pAGE210等を例示することができる。動物細胞用のプロモーターとしては、例えば、サイトメガロウイルス(ヒトCMV)のIE(immediate early)遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、SR $\alpha$ プロモーター等を挙げることができる。

【0037】植物細胞用の発現ベクターとしては、例えば、pIG121-Hm [Plant Cell Report, 15, 809-814(1995)]、pBI121 [EMBO J., 6, 3901-3907(1987)]等を例示することができる。植物細胞用のプロモーターとしては、例えば、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター [Mol. Gen. Genet. (1990) 220, 389-392]、ルブロースビスフォスフェートカルボキシラーゼスモールサブユニットプロモーター等を挙げることができる。

【0038】(3) 本発明の遺伝子を有する形質転換体本発明のMAPキナーゼp38 $\alpha$ の新規なスプライシング変異体をコードする遺伝子を有する形質転換体は、上記した組み換えベクター(好ましくは発現ベクター)を宿主に導入することにより作製することができる。細菌の宿主細胞の具体例としては、Escherichia属、Corynebacterium属、Brevibacterium属、Bacillus属、Microbacterium属、Serratia属、Pseudomonas属、Agrobacterium属、Alicyclobacillus属、Anabaena属、Anacystis属、A

erthrobacter属、Azobacter属、Chromatium属、Erwinia属、Methylobacterium属、Phormidium属、Rhodobacter属、Rhodopseudomonas属、Rhodospirillum属、Scenedesmun属、Streptomyces属、Synnecoccus属、Zymomonas属等に属する微生物を挙げることができる。細菌宿主へ組換えベクターを導入する方法としては、例えば、カルシウムイオンを用いる方法やプロトプラスト法等を挙げることができる。

【0039】酵母宿主の具体例としては、サッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)、シゾサッカロミセス・ボンベ(Schizosaccharomyces pombe)、クリュイベロミセス・ラクチス(Kluyveromyces lactis)、トリコスポロン・プルランス(Trichosporon pullulan s)、シュワニオミセス・アルビウス(Schwanniomyces al luvius)等を挙げることができる。酵母宿主への組み換えベクターの導入方法としては、例えば、エレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法等を挙げることができる。

【0040】動物細胞宿主としては、ナマルバ細胞、COS1細胞、COS7細胞、CHO細胞等を挙げることができる。動物細胞への組み換えベクターの導入方法としては、例えば、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等を用いることができる。

【0041】昆虫細胞を宿主として用いる場合には、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、タンパク質を発現させることができる(例えば、Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual; 及びカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Bio/Technology, 6, 47(1988)等に記載)。

【0042】バキュロウイルスとしては、例えば、ヨトウガ科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフィ・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス(Autographa californica nuclear polyhedrosis virus)等を用いることができる。昆虫細胞としては、Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞であるSf9、Sf21

(バキュロウイルス・エクスプレッション・ベクターズ、ア・ラボラトリー・マニュアル、ダブリュー・エイチ・フリーマン・アンド・カンパニー(W. H. Freeman and Company)、ニューヨーク(New York)、(1992))、Trichoplusia niの卵巣細胞であるHiFive(インビトロジェン社製)等を用いることができる。組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法又はリポフェクション法等を挙げることができる。

【0043】(4) 本発明の形質転換体を用いた組み換えタンパク質の製造



本発明においては、上記のようにして作製した本発明の遺伝子を有する形質転換体を培養し、培養物中に本発明のタンパク質を生成蓄積させ、該培養物より本発明のタンパク質を採取することにより組み換えタンパク質を単離することができる。

【0044】本発明の形質転換体が大腸菌等の原核生物、酵母菌等の真核生物である場合、これら微生物を培養する培地は、該微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれでもよい。培養は、振盪培養または深部通気攪拌培養などの好気的条件下で行うことが好ましく、培養温度は通常15~40℃であり、培養時間は、通常16時間~7日間である。培養中、pHは3.0~9.0に保持する。pHの調整は、無機あるいは有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。また培養中に必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0045】動物細胞を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRP M1640培地〔The Journal of the American Medical Association, 199, 519(1967)〕、EagleのMEM培地〔Science, 122, 501(1952)〕、DMEM培地〔Virology, 8, 396(1959)〕、199培地〔Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1(1950)〕またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等が用いられる。培養は、通常pH6~8、30~40℃、5%CO<sub>2</sub>存在下の条件下で1~7日間行う。また、培養中に必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0046】植物細胞を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、MS培地、R2P培地等、その植物種に応じて通常用いられる培地が用いられる。培養は、通常pH6~8、15~35℃等の条件下で1~21日間行う。また、培養中に必要に応じて、カナマイシン、ハイグロマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0047】形質転換体の培養物から、本発明のタンパク質を単離精製するには、通常のタンパク質の単離、精製法を用いればよい。例えば、本発明のタンパク質が、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し水系緩衝液に懸濁後、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、通常のタンパク質の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル(DEAE)セファロース、DIAION HPA-75(三菱化成社製)等レジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF(ファルマシア社製)等のレジンを用いた陽イオン交換クロ

マトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせ用い、精製標品を得ることができる。

【0048】また、該タンパク質が細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破碎し、遠心分離を行うことにより得られた沈殿画分より、通常の方法により該タンパク質を回収後、該タンパク質の不溶体をタンパク質変性剤で可溶化する。該可溶化液を、タンパク質変性剤を含まないあるいはタンパク質変性剤の濃度がタンパク質が変性しない程度に希薄な溶液に希釈、あるいは透析し、該タンパク質を正常な立体構造に構成させた後、上記と同様の単離精製法により精製標品を得ることができる。

【0049】(5)本発明のタンパク質に対する抗体本発明によりEXIPタンパク質が同定されたことにより、該タンパク質に対する抗体を作製することができる。このような抗体の作製は、当該タンパク質を含めMAPキナーゼp38 $\alpha$ の動態を解明する研究において有用である。本発明の抗体はポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でもよく、その作製は定法により行うことができる。

【0050】例えば、本発明のタンパク質を認識するポリクローナル抗体は、本発明のタンパク質を抗原として哺乳動物を免疫感作し、該哺乳動物から血液を採取し、採取した血液から抗体を分離・精製することにより得ることができる。例えば、マウス、ハムスター、モルモット、ニワトリ、ラット、ウサギ、イヌ、ヤギ、ヒツジ、ウシ等の哺乳動物を免疫することができる。免疫感作の方法は当業者に公知であり、例えば抗原を1回以上投与することにより行うことができる。抗原投与は、例えば7~30日間隔で2~3回投与すればよい。投与量は1回につき、例えば抗原約0.05~2mg程度とすることができる。投与経路も特に限定されず、皮下投与、皮内投与、腹腔内投与、静脈内投与、筋肉内投与等を適宜選択することができるが、静脈内、腹腔内もしくは皮下に注射することにより投与することが好ましい。また、抗原は適当な緩衝液、例えば完全フロイントアジュバントまたは水酸化アルミニウム等の通常用いられるアジュバントを含有する適当な緩衝液に溶解して用いることができるが、投与経路や条件等に応じてアジュバントを使用しない場合もある。

【0051】免疫感作した哺乳動物を一定期間飼育した後、該哺乳動物の血清をサンプリングし、抗体価を測定する。抗体価が上昇してきたら、例えば100 $\mu$ g~1000 $\mu$ gの抗原を用いて追加免疫を行なう。最後の投与から1~2ヶ月後に免疫感作した哺乳動物から血液を採取して、該血液を、例えば遠心分離、硫酸アンモニウ

ムまたはポリエチレングリコールを用いた沈澱、ゲルろ過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等のクロマトグラフィー等の常法によって分離・精製することにより、ポリクローナル抗血清として、本発明のタンパク質を認識するポリクローナル抗体を得ることができる。なお血清は、たとえば、56℃で30分間処理することによって補体系を不活性化してもよい。

【0052】本発明のタンパク質を認識するモノクローナル抗体のグロブリンタイプは特に限定されず、例えば IgG、IgM、IgA、IgE、IgD等が挙げられる。本発明のモノクローナル抗体を産生する細胞株は特に制限されないが、例えば、抗体産生細胞とミエローマ細胞株との細胞融合によりハイブリドーマとして得ることができる。本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、以下のような細胞融合法によって得ることができる。

【0053】抗体産生細胞としては、免疫された動物からの脾細胞、リンパ節細胞、Bリンパ球等を使用する。抗原としては、本発明のタンパク質又はその部分ペプチドを使用する。免疫動物としてはマウス、ラット等を使用でき、これらの動物への抗原の投与は常法により行う。例えば完全フロインドアジュバント、不完全フロインドアジュバントなどのアジュバントと抗原である本発明のタンパク質との懸濁液もしくは乳化液を動物の静脈、皮下、皮内、腹腔内等に数回投与することによって動物を免疫化する。免疫化した動物から抗体産生細胞として例えば脾細胞を取得し、これとミエローマ細胞とを公知の方法 (G.Kohler et al., Nature, 256495 (1975)) により融合してハイブリドーマを作製することができる。

【0054】細胞融合に使用するミエローマ細胞株としては、例えばマウスではP3X63Ag8、P3U1株、Sp2/0株などが挙げられる。細胞融合を行なうに際しては、ポリエチレングリコール、センダイウイルスなどの融合促進剤を用い、細胞融合後のハイブリドーマの選択にはヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン (HAT) 培地を常法に従って使用する。細胞融合により得られるハイブリドーマは限界希釈法等によりクローニングする。さらに必要に応じて、本発明のタンパク質を用いた酵素免疫測定法によりスクリーニングを行なうことにより、本発明のタンパク質を特異的に認識するモノクローナル抗体を産生する細胞株を得ることができる。

【0055】このようにして得られたハイブリドーマから目的とするモノクローナル抗体を製造するには、通常細胞培養法や腹水形成法により該ハイブリドーマを培養し、培養上清あるいは腹水から該モノクローナル抗体を精製すればよい。培養上清もしくは腹水からのモノクローナル抗体の精製は、常法により行なうことができ

る。例えば、硫酸分画、ゲルろ過、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどを適宜組み合わせて使用できる。

【0056】本発明のモノクローナル抗体を用いて本発明のEXIPタンパク質を免疫測定するための方法としては、例えば酵素免疫測定法、ラジオイムノアッセイ、蛍光免疫測定法、発光免疫測定法等を挙げることができる。

【0057】また、上記した抗体の断片も本発明の範囲内である。抗体の断片としては、F(ab')<sub>2</sub>フラグメント、Fab'フラグメント等が挙げられる。さらに、上記した抗体の標識抗体も本発明の範囲内である。即ち、上記のようにして作製した本発明の抗体は標識して使用することができる。抗体の標識の種類及び標識方法は当業者に公知である。例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ又はアルカリホスファターゼなどの酵素標識、FITC (フルオレセインイソチオシアネート) 又はTRITC (テトラメチルローダミンBイソチオシアネート) 等の蛍光標識、コロイド金属および着色ラテックスなどの呈色物質による標識、ビオチンなどのアフィニティー標識、あるいは<sup>125</sup>Iなどの同位体標識などを挙げることができる。本発明の標識抗体を用いた酵素抗体法、免疫組織染色法、免疫プロット法、直接蛍光抗体法又は間接蛍光抗体法等の分析は当業者に周知の方法により行うことができる。

【0058】(6) 本発明のタンパク質を用いたスクリーニング法及び診断方法

抗炎症薬であるSB202190やSB203580は、ストレスや炎症性サイトカインにより活性化されるMAPキナーゼp38の阻害剤として知られる。ATPキナーゼp38ファミリーはα、β、γ、δアイソフォームから成るが、上記の抗炎症薬は、特にp38αのCSBP2と特異的に結合してそのキナーゼ活性を阻害することが知られている。このことは、CSBP2が存在した場合には、炎症が促進することを意味する。選択的スプライシングが起こって、本発明のEXIPの発現が多くなれば、p38 (CSBP2) が発現は起こらないか、又は抑制され、抗炎症作用が期待できる。従って、本発明のEXIPの発現を促進又は抑制する物質をスクリーニングすれば、該物質はスプライシングを指標とした新たな医薬を開発することが可能になることが期待できる。このような物質のスクリーニング系は、例えば以下の通り構築することができる。

【0059】本発明の遺伝子を有する発現ベクターを構築し、この発現ベクターを、p38 (CSBP2) 発現する適当な宿主に導入する。得られる形質転換体を被験物質存在下で培養して、本発明のタンパク質であるEXIPと、p38 (CSBP2) の発現量を調べる。あるいは、内在性のEXIPを発現する細胞に本発明の遺伝子を有する発現ベクターを導入し、被験物質の存在下で



培養して、本発明のタンパク質であるEXIPの発現量を調べる。

【0060】被験物質を添加した場合にEXIPの発現量が増大すれば、その被験物質は、選択的スプライシング機構を促進し、p38 (CSBP2) の発現を阻害する物質の候補物質として選択することができる。反対に、被験物質を添加した場合にEXIPの発現量が減少すれば、その被験物質は、選択的スプライシング機構を阻害し、p38 (CSBP2) の発現を促進する物質の候補物質として選択することができる。

【0061】上記スクリーニング系で使用することができる発現ベクター、宿主細胞などは当業者であれば適宜選択することができ、本明細書中上記したものを使用してもよい。被験物質としては任意の物質を使用することができ、その種類は特に限定されない。被験物質の具体例としては、低分子合成化合物でもよいし、天然物抽出物でもよく、あるいは化合物ライブラリー、ファージディスプレイライブラリーもしくはコンビナトリアルライブラリーでもよい。化合物ライブラリーの構築は当業者に公知であり、また市販の化合物ライブラリーを使用することもできる。さらに、上記した本発明のタンパク質の発現を測定又は検出することによってMAPキナーゼ関連疾患を診断することもできる。MAPキナーゼ関連疾患としては、MAPキナーゼの発現異常を伴う疾患が挙げられ、各種の炎症、腫瘍、リウマチなどが挙げられる。本発明においては、被験者由来の生体試料において、本発明のタンパク質の発現を測定又は検出することによって上記した疾患を診断することができる。以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は以下の実施例により特に限定されるものではない。

#### 【0062】

【実施例】（実施例1）p38 $\alpha$ の新規なスプライシング変異体遺伝子の同定

ヒト腎癌細胞株OS-RC-2（理研ジーンバンクより分譲；RCBO735；Kinouchi T et al. In vitro CELLULAR & Developmental Biology 21, 195 (1985)よりmRNAをIsogen（ニッポンジーン社）により抽出し、逆転写酵素Superscript II（Invitrogen社製）を用いてcDNAを合成した。p38 (CSBP2) cDNAにおけるタンパク質をコードする領域の全長をクローニングするためのプライマー：5'-AATCGATGTCTCAGGAGAGGCCACGTTTC-3'（6位のAが、p38 (CSBP2) の翻訳開始のATGのAに相当し、後のクローニング用に人工のClaI サイトを5'に加えてある。；配列番号3）、及びプライマー：5'-GTTCCCGTGAAAGGCCTTCCCTCAC-3'（p38 (CSBP2) の終止コドンの80塩基下流の非翻訳領域；配列番号4）とを設計し、94℃、30秒、62℃、30秒、72℃、80秒を1サイクルとするPCR反応を30サイクル行った。1%アガロース電気泳動をすることにより、増幅された約1100塩基対の単一のDNA断片を回収した後、pGEM-Tベクター（Promega社製）にサブクロー

ニングし、大腸菌にトランスフォームした。

【0063】154個の独立した大腸菌からプラスミドを回収し、上記のプライマーを用いて再びPCRによりインサートの長さを検討したところ、4つのクローンでインサートがわずかに短いことが判明した（図2）。これらの短いインサートの配列を調べたところ、いずれもp38 (CSBP2) の79bpの第10エクソン（Facio L. et al., Am. J. Physiol. Cell Physiol., 278, C781-790, 2000及びNCBI, Entrez, Accession Z95152, ヒトp38を含むGenomic cloneを参照）がスプライシングにより除かれたものであることが明らかになった。そこで、このインサート部分の遺伝子、及び遺伝産物をEXIPと名付け、それを含むプラスミドをpGEMEXIPとした。

【0064】（実施例2）マウス組織におけるEXIP遺伝子発現

実施例1で同定されたEXIP遺伝子は、p38 (CSBP2) 遺伝子より79bpが除かれたことによってフレームシフトが起こり、N末側の254アミノ酸はp38 (CSBP2) の配列が保存されているものの、C末側の53アミノ酸は全く異なる配列からなる307アミノ酸のタンパク質をコードしている。

全長で79bpの差違（p38 (CSBP2) ）；507bp、EXIP；428bp）を検出することは難しいので、p38 (CSBP2) とEXIPとを容易に区別するPCRの系を構築した。具体的には、スプライシングで除かれるエクソンを挟むふたつのプライマー、5'-GCCGAGCTGTTGACTGGAAGAACATTG-3'（アミノ酸214から222番に相当；配列番号5）および5'-GTTCCCGTGAAAGGCCTTCCCTCAC-3'（前述；配列番号4）を合成し、94℃、30秒、67℃、30秒、72℃、40秒を1サイクルとするPCR反応を35サイクル行った後、2%アガロース電気泳動による解析を行う。

【0065】この解析により、マウスの種々の組織（心臓、腎臓、腸、胸腺、脾臓、肺、精巣、胃、脳、肝臓、横隔膜）におけるp38 (CSBP2)、EXIP両遺伝子の発現を調べたところ、個体差はあるものの、生理的条件下で各組織において発現が見られた（図3）。しかしながら、培養細胞では検出限界以下であることがわかった（図4）。

【0066】（実施例3）融合タンパクの発現  
EXIP遺伝子をHeLa細胞にFlagとの融合蛋白として一過的に発現させ、M2抗体によりウエスタンブロッティングにて検出することを試みた。まず、pcDNA3ベクター（Invitrogen社製）のHind III部位に、抗Flag抗体によって認識されるペプチド（Met-Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-Ser；配列番号6）をコードする合成DNAを挿入した。またこの際、C末端には、制限酵素ClaI（ATCGAT）によって切断される配列を配して、EXIPとの融合タンパク質作製の際に上記ClaI 認識部位中に下線で示したATが、EXIP自身の翻訳開始のメチオニンをコードするATGのAT部分に相当するようにした。このようにして得られたプラスミドベクターを改変pcDNA3ベクターと呼ぶ。次



に、実施例 1 で作製した pGEMEXIP を制限酵素 ClaI と XbaI で消化し、EXIP の翻訳領域を全て含む DNA 断片を取得し、前記 pcDNA3 改変ベクターの ClaI と XbaI にクローニングした。

【0067】得られたプラスミド大腸菌に導入し、大量のプラスミドを塩化リチウム法 (Sambrook et al., Molecular Cloning 2nd edition, 1989) により精製した。そして、前日に植え継いだ HeLa 細胞に Effectene (Qiagen 社) を用いて精製プラスミドを導入し、36 時間後に回収し、細胞の全溶解液を 12% ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離した。PVDF 膜に転写後、シグマ社製の抗 Flag 抗体により検出を行った (図 5)。分子量は約 36kD

であり、予想された計算上の分子量 35453 と Flag ペプチドとを加えた分子量とほぼ一致した。

【0068】

【発明の効果】本発明により、選択的スプライシングの結果生じる MAP キナーゼ p38 $\alpha$  の新たなスプライシング変異体が同定された。本発明によれば、該変異体をコードする遺伝子および該変異体に対する抗体が提供される。本発明の変異体を利用することにより、医薬のスクリーニングおよび疾患の診断を行うことが可能である。

【0069】

【配列表】

# SEQUENCE LISTING

<110> RIKEN

<120> A Novel MAP kinase spliced variant

<130> A11545MA

<160> 5

【0070】

<210> 1

<211> 307

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met	Ser	Gln	Glu	Arg	Pro	Thr	Phe	Tyr	Arg	Gln	Glu	Leu	Asn	Lys	Thr
1				5				10						15	
Ile	Trp	Glu	Val	Pro	Glu	Arg	Tyr	Gln	Asn	Leu	Ser	Pro	Val	Gly	Ser
			20					25					30		
Gly	Ala	Tyr	Gly	Ser	Val	Cys	Ala	Ala	Phe	Asp	Thr	Lys	Thr	Gly	Leu
			35				40					45			
Arg	Val	Ala	Val	Lys	Lys	Leu	Ser	Arg	Pro	Phe	Gln	Ser	Ile	Ile	His
			50				55				60				
Ala	Lys	Arg	Thr	Tyr	Arg	Glu	Leu	Arg	Leu	Leu	Lys	His	Met	Lys	His
			65			70			75				80		
Glu	Asn	Val	Ile	Gly	Leu	Leu	Asp	Val	Phe	Thr	Pro	Ala	Arg	Ser	Leu
			85					90					95		
Glu	Glu	Phe	Asn	Asp	Val	Tyr	Leu	Val	Thr	His	Leu	Met	Gly	Ala	Asp
			100					105					110		
Leu	Asn	Asn	Ile	Val	Lys	Cys	Gln	Lys	Leu	Thr	Asp	Asp	His	Val	Gln
			115				120						125		
Phe	Leu	Ile	Tyr	Gln	Ile	Leu	Arg	Gly	Leu	Lys	Tyr	Ile	His	Ser	Ala
			130				135						140		
Asp	Ile	Ile	His	Arg	Asp	Leu	Lys	Pro	Ser	Asn	Leu	Ala	Val	Asn	Glu
			145			150			155				160		
Asp	Cys	Glu	Leu	Lys	Ile	Leu	Asp	Phe	Gly	Leu	Ala	Arg	His	Thr	Asp
			165					170					175		
Asp	Glu	Met	Thr	Gly	Tyr	Val	Ala	Thr	Arg	Trp	Tyr	Arg	Ala	Pro	Glu
			180					185					190		
Ile	Met	Leu	Asn	Trp	Met	His	Tyr	Asn	Gln	Thr	Val	Asp	Ile	Trp	Ser
			195				200						205		
Val	Gly	Cys	Ile	Met	Ala	Glu	Leu	Leu	Thr	Gly	Arg	Thr	Leu	Phe	Pro

19  
210 215 220  
Gly Thr Asp His Ile Asp Gln Leu Lys Leu Ile Leu Arg Leu Val Gly  
225 230 235 240  
Thr Pro Gly Ala Glu Leu Leu Lys Lys Ile Ser Ser Glu Ser Leu Ser  
245 250 255  
Thr Cys Trp Arg Arg Cys Leu Tyr Trp Thr Gln Ile Arg Glu Leu Gln  
260 265 270  
Arg Pro Lys Pro Leu His Met Pro Thr Leu Leu Ser Thr Thr Ile Leu  
275 280 285  
Met Met Asn Gln Trp Pro Ile Leu Met Ile Ser Pro Leu Lys Ala Gly  
290 295 300  
Thr Ser Leu  
305

【0071】

<210> 2  
<211> 1004  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens  
<400> 2  
atg tct cag gag agg ccc acg ttc tac cgg cag gag ctg aac aag aca 48  
Met Ser Gln Glu Arg Pro Thr Phe Tyr Arg Gln Glu Leu Asn Lys Thr  
1 5 10 15  
atc tgg gag gtg ccc gag cgt tac cag aac ctg tct cca gtg ggc tct 96  
Ile Trp Glu Val Pro Glu Arg Tyr Gln Asn Leu Ser Pro Val Gly Ser  
20 25 30  
ggc gcc tat ggc tct gtg tgt gct gct ttt gac aca aaa acg ggg tta 144  
Gly Ala Tyr Gly Ser Val Cys Ala Ala Phe Asp Thr Lys Thr Gly Leu  
35 40 45  
cgt gtg gca gtg aag aag ctc tcc aga cca ttt cag tcc atc att cat 192  
Arg Val Ala Val Lys Lys Leu Ser Arg Pro Phe Gln Ser Ile Ile His  
50 55 60  
gcg aaa aga acc tac aga gaa ctg cgg tta ctt aaa cat atg aaa cat 240  
Ala Lys Arg Thr Tyr Arg Glu Leu Arg Leu Leu Lys His Met Lys His  
65 70 75 80  
gaa aat gtg att ggt ctg ttg gac gtt ttt aca cct gca agg tct ctg 288  
Glu Asn Val Ile Gly Leu Leu Asp Val Phe Thr Pro Ala Arg Ser Leu  
85 90 95  
gag gaa ttc aat gat gtg tat ctg gtg acc cat ctc atg ggg gca gat 336  
Glu Glu Phe Asn Asp Val Tyr Leu Val Thr His Leu Met Gly Ala Asp  
100 105 110  
ctg aac aac att gtg aaa tgt cag aag ctt aca gat gac cat gtt cag 384  
Leu Asn Asn Ile Val Lys Cys Gln Lys Leu Thr Asp Asp His Val Gln  
115 120 125  
ttc ctt atc tac caa att ctc cga ggt cta aag tat ata cat tca gct 432  
Phe Leu Ile Tyr Gln Ile Leu Arg Gly Leu Lys Tyr Ile His Ser Ala  
130 135 140  
gac ata att cac agg gac cta aaa cct agt aat cta gct gtg aat gaa 480  
Asp Ile Ile His Arg Asp Leu Lys Pro Ser Asn Leu Ala Val Asn Glu  
145 150 155 160  
gac tgt gag ctg aag att ctg gat ttt gga ctg gct cgg cac aca gat 528

21

22

Asp Cys Glu Leu Lys Ile Leu Asp Phe Gly Leu Ala Arg His Thr Asp  
 165 170 175  
 gat gaa atg aca ggc tac gtg gcc act agg tgg tac agg gct cct gag 576  
 Asp Glu Met Thr Gly Tyr Val Ala Thr Arg Trp Tyr Arg Ala Pro Glu  
 180 185 190  
 atc atg ctg aac tgg atg cat tac aac cag aca gtt gat att tgg tca 624  
 Ile Met Leu Asn Trp Met His Tyr Asn Gln Thr Val Asp Ile Trp Ser  
 195 200 205  
 gtg gga tgc ata atg gcc gag ctg ttg act gga aga aca ttg ttt cct 672  
 Val Gly Cys Ile Met Ala Glu Leu Leu Thr Gly Arg Thr Leu Phe Pro  
 210 215 220  
 ggt aca gac cat att gat cag ttg aag ctc att tta aga ctc gtt gga 720  
 Gly Thr Asp His Ile Asp Gln Leu Lys Leu Ile Leu Arg Leu Val Gly  
 225 230 235 240  
 acc cca ggg gct gag ctt ttg aag aaa atc tcc tca gag tct ctg tgc 768  
 Thr Pro Gly Ala Glu Leu Leu Lys Lys Ile Ser Ser Glu Ser Leu Ser  
 245 250 255  
 act tgc tgg aga aga tgc ttg tat tgg act cag ata aga gaa tta cag 816  
 Thr Cys Trp Arg Arg Cys Leu Tyr Trp Thr Gln Ile Arg Glu Leu Gln  
 260 265 270  
 cgg ccc aag ccc ttg cac atg cct act ttg ctc agt acc acg atc ctg 864  
 Arg Pro Lys Pro Leu His Met Pro Thr Leu Leu Ser Thr Thr Ile Leu  
 275 280 285  
 atg atg aac cag tgg ccg atc ctt atg atc agt cct ttg aaa gca ggg 912  
 Met Met Asn Gln Trp Pro Ile Leu Met Ile Ser Pro Leu Lys Ala Gly  
 290 295 300  
 acc tcc tta tagatgagtg gaaaagccctg acctatgatg aagtcacag 961  
 Thr Ser Leu  
 305  
 ctctgtgccca ccaccccttg accaagaaga gatggagtcc tga 1004

【 0 0 7 2 】

<210> 3  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 3

aatcgaatgic tcaggagagg cccacgttc 29

【 0 0 7 3 】

<210> 4  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 4

gttcccgtga aaaggccttc cccacac 27

【 0 0 7 4 】

<210> 5  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 5



23  
gccgagcigt tgactggaag aacattg

27

【0075】

<210> 6  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<400> 6  
Met Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Ser

5

10

【図面の簡単な説明】

【図1】 MAPキナーゼp38 $\alpha$ のこれまで同定されているp38 (CSBP2)、CSBP1、Mx12と、選択的スプライシングによる新規な変異体 (EXIP) の構造を示す。

【図2】 ヒト腎癌細胞由来cDNAのPCR増幅物に対するゲル電気泳動図を示す。

【図3】 マウスの種々の各組織におけるp38、EXIP両

10 遺伝子の発現を検出した結果を示す。(H:心臓、K:腎臓、I:腸、Th:胸腺、Sp:脾臓、L:肺、T:精巣、S:胃、B:脳、Li:肝臓、D:横隔膜)

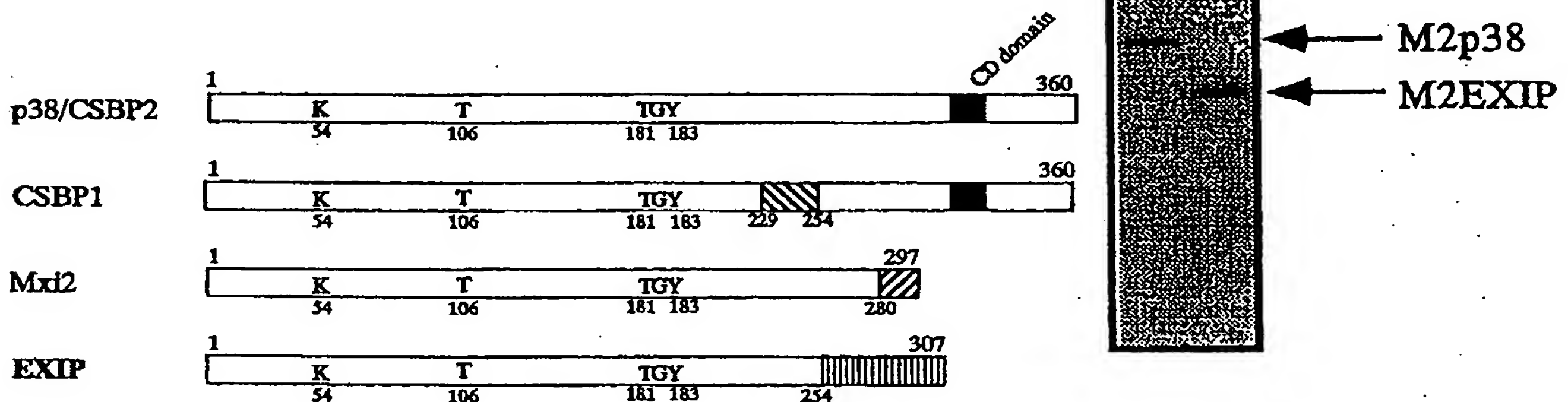
【図4】 p38、EXIP両遺伝子の培養細胞における発現を検出した結果を示す。

【図5】 Flagとの融合タンパクとして発現させたEXIPのゲル電気泳動結果を示す。

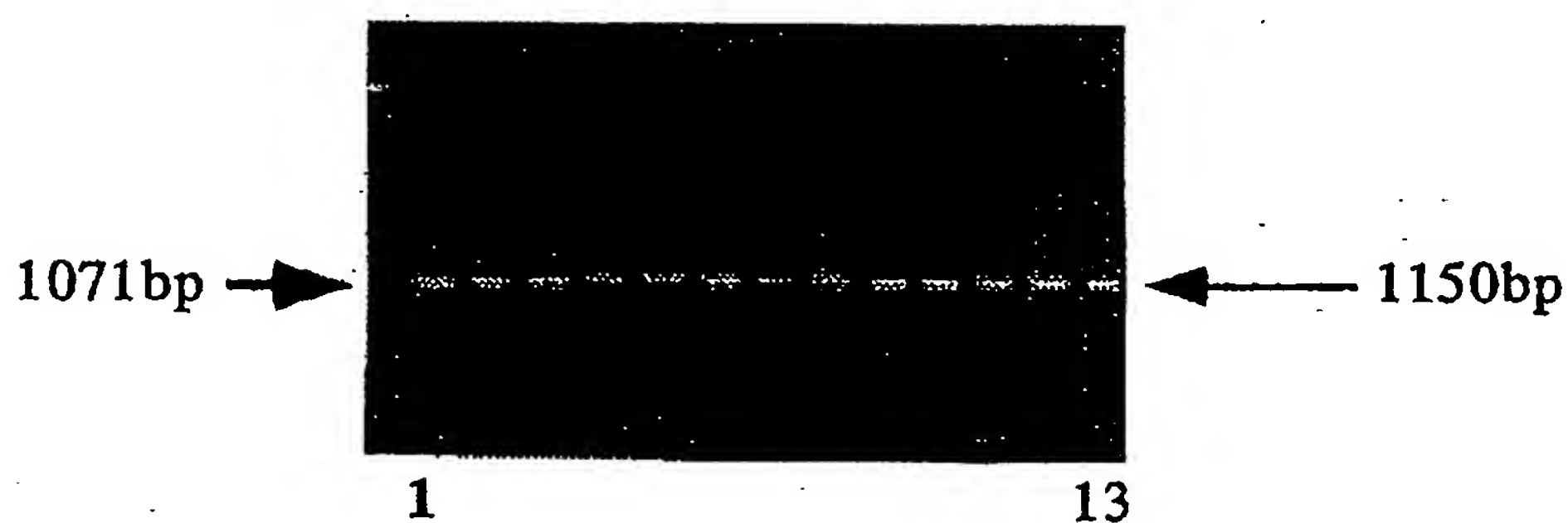
【図1】

【図5】

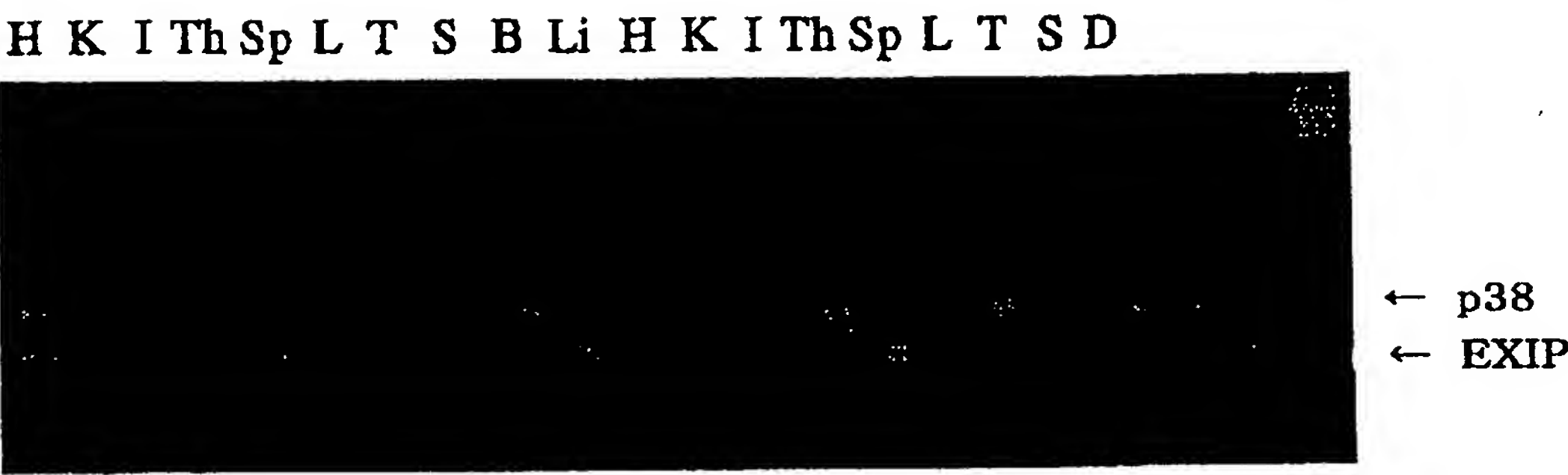
### Primary structures of splicing variants of p38 MAP kinase



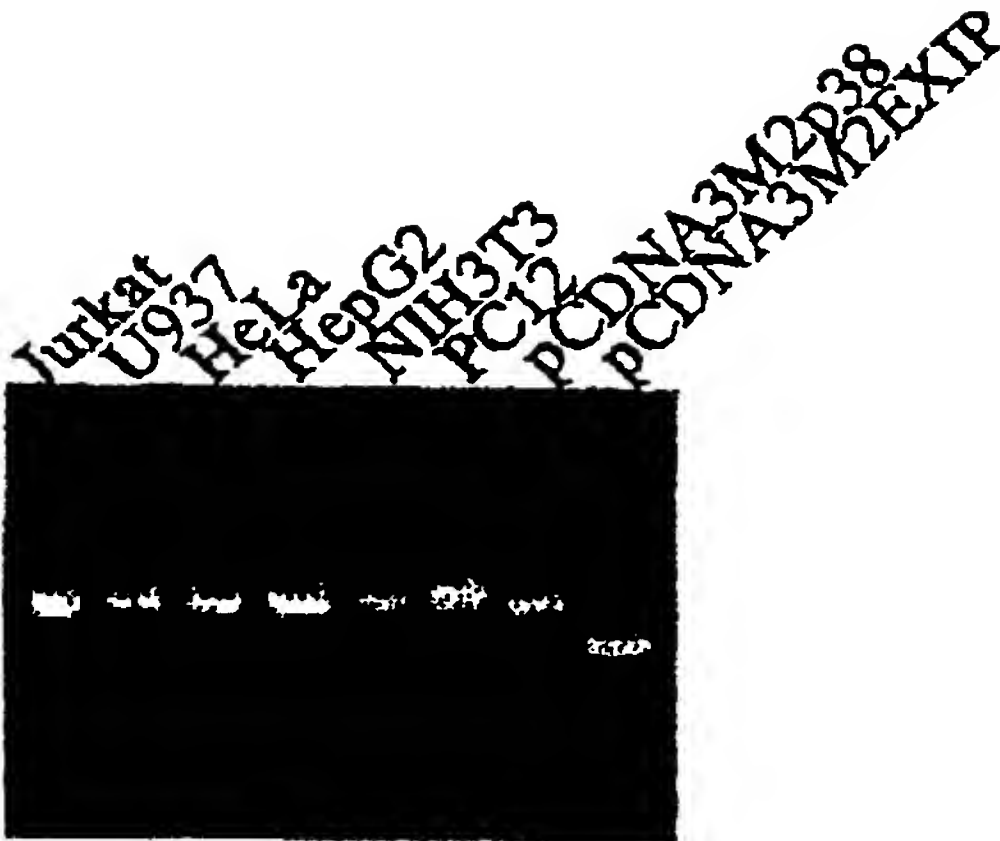
【図2】



【図 3】



【図 4】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N	1/21	C 1 2 N 9/02	4 C 0 8 4
	5/10	C 1 2 Q 1/48	Z 4 H 0 4 5
	9/02	G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 Q	1/48		Z
G 0 1 N	33/15		D
	33/50		A
	33/53	A 6 1 K 45/00	
	33/573	C 1 2 N 15/00	Z N A A
// A 6 1 K	45/00	5/00	A

F ターム(参考) 2G045 AA34 AA35 CB01 DA13 DA36  
FB01 FB02 FB03 FB05  
4B024 AA11 BA10 CA04 DA02 DA06  
EA04 GA11 HA12  
4B050 CC03 DD11 LL03  
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ27 QR59  
QR80 QS24 QS28  
4B065 AA26X AA91X AA93Y AB01  
AC14 CA29 CA46  
4C084 AA16 DC25 NA14 ZC20  
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 CA40  
DA76 DA89 EA50 FA72 FA74



THIS PAGE BLANK (USPTO)